پژوهش‌های حبوبات ایران
سال(دوره)۱۱ شمارهٔ۱، نیمهٔ اوّل ۱۳۹۹
صفحهٔ ۳۷-۲۶، نوع مقاله: پژوهشی

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 11, No. 1, 2020, p. 26-37 (Research Article)
DOI: 10.22067/ijpr.v11i1.73594

ردیابی و توالی‌یابی ژن کُدکنندهٔ پروتئین مرتبط با بیماریزایی PR10 در نخود (*Cicer arietinum* L.)

مریم نوری شکرتو[1]، فاطمه ذاکر تولایی[2]* و فرهاد شکوهی‌فر[3]
۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، مجتمع آموزش‌عالی شیروان؛ mnoori20409@gmail.com
۲- استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی و عضو هیئت علمی مجتمع آموزش‌عالی شیروان
۳- استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی و عضو هیئت علمی پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ shokouhifar@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۲۷

چکیده

در بین حبوبات، نخود از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است و از جمله عوامل محدودکننده عملکرد آن، می‌توان به برق‌زدگی نخود اشاره کرد. استفاده از پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی یکی از راهکارهای مقابله گیاهان با عوامل بیماریزا به‌شمار می‌رود. یکی از ژن‌های کُدکننده این نوع پروتئین‌ها، ژن کدکننده PR-10 است. این پژوهش با هدف ردیابی ژنPR-10 در ژنوم گیاه نخود انجام شد. بدین منظور DNAی ژنومی شِش ژنوتیپ نخود با مقاومت متفاوت نسبت به بیماری شامل دو رقم مقاوم MCC142 و MDD528، دو رقم متحمل MCC150 و MCC20 و دو رقم حساس MCC507 و MCC506 به روشCTAB استخراج گردید. با استفاده از آغازگرهای PSH-91 و MN واکنش PCR طی دو مرحله انجام شد. مرحله اول با استفاده از DNAی ژنومی نخود و با آغازگرPSH91 و مرحله دوم با استفاده از محصولات مرحله اول و آغازگرMN انجام شد. سپس تخلیص باندها به‌وسیله کیت صورت گرفت و جهت توالی‌یابی ارسال شد. حضور تک‌باند ۱۳۵۰جفت بازی در مرحله اول و حضور تک‌باند ۱۲۸۹بازی در مرحله دوم بیانگر حضور ژنPR-10 در ژنوم نخود می باشد. نتایج این آزمون حاکی از عدم تفاوت در توالی‌های ژن کدکننده پروتئینPR-10 در ارقام نخود با سطوح مقاومتی متفاوت بود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت در واکنش ارقام نسبت به بیماری، به تفاوت در توالی این ژن مربوط نیست و دلایل دیگری مقاومت متفاوت را ایجاد می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: نخود، (*Cicer arietinum* L.) ، پروتئین های مرتبط با بیماری زایی، برق‌زدگی، PR-10

مقدمه

ایران از نظر سطح زیرکشت نخود در جهان پس از هندوستان و پاکستان در رتبه سوم و از نظر تولید در رتبه هفتم قرار دارد (FAO, 2014). به گزارش فائو، ۱۲درصد کل حبوبات تولیدشده در جهان مربوط به نخود بوده و این گیاه پس از نخودفرنگی و لوبیا در رتبه سوم قرار دارد (Yadav *et al.*, 2015). سطح زیرکشت نخود کشور حدود ۵۲۸هزارهکتار برآورد شده که معادل ۴/۴۶درصد از کل محصولات زراعی و حدود ۶۴/۳درصد از کل سطح برداشت حبوبات می‌باشد. میزان تولید نخود در کشور حدود ۲۶۹هزارتُن برآورد شده است که معادل ۰/۳۶درصد از میزان تولید محصولات زراعی و ۴۳/۷درصد از کل میزان تولید حبوبات می‌باشد (Ahmadi *et al.*, 2016). یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده عملکرد نخود، بیماری‌های قارچی می‌باشد. بیماری برق‌زدگی یکی از بیماری‌های مهم نخود در سراسر جهان از جمله غرب کانادا، شمال آفریقا، شمال آمریکا، استرالیا، آسیای مرکزی و خاورمیانه محسوب می‌شود که توسط *Ascochyta rabiei* ایجاد می‌شود (Shokoohifar *et al.*, 2003 & Taran *et al.*, 2013). بروز و شیوع این بیماری به آب و هوا بستگی دارد. در برخی از سال‌ها، شرایط آب و هوای سرد و مرطوب، توسعه این بیماری را افزایش داده و اغلب موجب ازدست‌رفتن ۱۰۰درصد عملکرد محصول می‌شود (Udupa *et al.*, 2003). در ایران پراکنش بیماری در شمال‌غرب، غرب، جنوب‌غربی و مرکز کشور گزارش شده است و در گلستان، کرمانشاه، ایلام، لرستان و فارس خسارات زیادی دربرداشته است (Ghiai *et al.*, 2012; Nourollahi *et al.*, 2009). نخود پاسخ‌های فعال و غیرفعال برای مقابله با این بیماری دارد. سازوکارهای دفاعی غیرفعال، شامل ایجاد موانع ساختاری و شیمیایی مانند کرک‌های غده‌ای است که ایجاد ایزوفلاون ضدقارچ می‌کند. سیستم‌های دفاعی فعال در گیاه، ممکن است ژن‌های مقاومت را به‌کار بگیرند. این بیماری می‌تواند با قارچ‌کش‌های مختلفی کنترل شود، اما با توجه به نگرانی‌های زیست‌محیطیِ قارچ‌کش

*نویسنده مسئول: f.zaker.t@um.ac.ir

ها، محققان به‌دنبال گزینه‌های دیگر مانند مقاومت در برابر پاتوژن‌ها و استفاده از عوامل زنده و غیرزنده برای ایجاد مقاومت هستند. مهم‌ترین سازوکار کنترل بیماری استفاده از ارقام مقاوم است (Ghazanfar *et al.*, 2011 & Leo *et al.*, 2016). مقاومت ژنتیکی نخود در برابر این بیماری به‌دلیل سطح بالایی از تنوع در خزانه ژنی میزبان، پیچیدگی اساس مولکولیQTLها و متغیربودن جمعیت پاتوژن با ظهور مداوم پاتوتایپ‌های جدید یک چالش است. افزایش فهم بشر از تعاملات بین گیاه-بیمارگر، ژن‌های دخیل در مقاومت و مسیرهای سیگنال‌دهی منتهی به مقاومت توانسته است راهکارهای ژنتیکی مناسب و کارآمدی به‌منظور افزایش مقاومت پیش روی محققان قرار دهد (Hashemi *et al.*, 2013). ژن‌های کُدکننده پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی که در بافت‌های گیاهان در تنش‌های مختلف تجمع می‌یابند، ازجمله برجسته‌ترین ژن‌ها هستند که محققان سعی کرده‌اند با افزایش بیان این ژن‌ها در گیاهان مختلف مقاومت آنها را به بیمارگرها بهبود بخشند (Hashemi *et al.*, 2013). یکی از واکنش‌های دفاعی القاشونده گروهی از پروتئین‌ها است که تحت عنوان پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی (PR) نامیده می شوند. پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی (PR) گروه متنوعی از پروتئین‌ها از جمله گلوکانازها، سیتینازها، اندوپروتئینازها، پراکسیدازها، مهارکننده‌های پروتئاز و همچنین پروتئین کوچک مانند اسموتین (Osmotins)، تیونین‌ها (Thionins)، دفنسین‌ها (Defensins) و پروتئین‌های انتقال چربی (Lipid Transfer Proteins) می‌باشند. (Jain *et al.*, 2012). تاکنون هفده PRپروتئین شناسایی شده است (Liu *et al.*, 2006; Moosa *et al.*, 2017).

پروتئینPR-10 درگیاهان مختلفی شناسایی شده است. مثلاً در گیاه نخودفرنگی بر روی رشد و جوانه‌زنی تأثیر گذاشته و موجب فعال‌شدن هورمون سیتوکینین می‌شود (Srivastava *et al.*, 2006). در گیاه فلفل (Capsicum baccatum) در برابر قارچ *Colletotrichum acutatum* که مولد بیماری سیاه‌تاول(Aanthracnose) است، ایجاد مقاومت می‌کند (Sohet *et al.*, 2012). PR-10 در گیاه برنج پس از آلودگی با *Magnaporthe grisea* القاء می‌شود (McGee *et al.*, 2001).گیاهان توتون و تنباکو تراریخته با تظاهرات بالای ژنAhsiPR-10 افزایش تحمل به شوری، فلزات سنگین و تنش خشکی، محتوای کلروفیل و اندازه جوانه‌زنی نشان داده است (Jainet *et al.*, 2012).در کشت کالوس بادام‌زمینی، در شرایط تنش شوری، خشکی و فلزات سنگین از کالوس، PR-10 جدا شده است (Jain *et al.*, 2012). تنظیم بیان PR-10 در طی عفونت به ویروس Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) در چغندر *Benthamiana nicotiana* ایجاد می‌شود (Wu *et al.*, 2014). پروتئین PR-10 رشد و سازگاری با محیط‌زیست را تنظیم می‌کند و به طور گسترده در دانه گیاهان توزیع شده است. بر اساس شباهت در توالی اسیدآمینه آن، جایگاه زیرسلولی و عملکرد احتمالی، خانواده PR-10 شامل دو گروه مشخص است: پروتئین مرتبط با بیماریزایی داخل سلولی (IPR) و (S)-norcoclaurine synthases (NCS). گروه IPR شامل ناحیه (ژن رمزگردان) ORF متشکل از ۴۵۶ تا ۴۸۹نوکلئوتید می‌باشد که پلی‌پپتید ۱۶۲-۱۵۱آمینواسیدی با وزن مولکولی ۱۸-۱۵کیلودالتون را کد می‌کند. اعضای گروهNCS شامل ORF طولانی‌تری با ۶۳۳-۶۹۶نوکلئوتید با وزن مولکولی حدود ۲۶کیلو دالتون می‌باشد (Liu *et al.*, 2006). برخی از PR-10 الگوهای بیان ساختاری غیرمرتبط با پاسخ به پاتوژن‌ها را نشان می‌دهند. تجمع ساختارPR-10 در طول رشد و تکامل گیاه در اندام گل شناسایی شده است (Liu *et al.*, 2006). پروتئینPR-10 دارای عملکردهای مختلفی می‌باشند. شواهد مستقیمی از فعالیت ضدمیکروبی که توسط PR-10 القاء می‌شود، در آزمایشگاه‌های میکروبی شناخته شده است. توانایی اتصال لیگاندها نیز در آن‌ها مشاهده شده است. همچنین دارای فعالیت آنزیمی در متابولیسم ثانویه گیاهان می‌باشد و در تنش‌های غیرزنده نیز ایفای نقش می‌کنند (Liu *et al.*, 2006). القای بیان ژنPR-10 گاهی در پاسخ به حمله عوامل بیماریزا به‌طور گسترده در تعدادی از گونه‌های گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است. مقاومت به سرما، به عنوان یک عامل مهم زیست محیطی، بیان PR-10 را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Liu *et al.*, 2006)). پروتئینPR-10 به‌طور وسیعی در همه خانواده‌های گیاهی یافت شده و در همه آن‌ها تقریباً اندازه و ساختار دوم پروتئین مشترک است. ساختار بعضی از آن‌ها با استفاده از اشعه ایکس و اسپکتروسکوپیNMR مشخص شده است. با وجود اطلاعات زیاد در مورد ساختار PR-10، اطلاعات در مورد عملکرد آن محدود است. پروتئینPR-10 نسبتاً کوچک و حدود ۱۶۰اسیدآمینه می‌باشد و از سه مارپیچ و هفت رشته ناموازیb تشکیل شده است. این عناصر ساختاری یک حفره بزرگ آبگریز را تشکیل می‌دهند که به احتمال زیاد کلید ارتباطات عملکردی آن باشد (Fernandes, 2013). این ژن معمولاً از دو اگزون قطع شده توسط اینترون با ۳۵۹-۷۶جفت باز و ناحیهORF با ۴۶۵-۴۸جفت باز تشکیل شده است. منطقه متغیر در این ژن بیشتر در ناحیهC ترمینال آن واقع

شده است. توالی این پروتئین در تعدادی از گیاهان شناسایی شده است (Fernandes *et al*., 2013). Shokoohifar *et al*, 2003) با مطالعه ۹۴جدایه از استان‌های مختلف ایران توانستند شش سطح مقاومتی در ارقام افتراقی تعیین نمایند و بر اساس قدرت بیماریزایی لازم جهت شکستن این سطوح شش گروه پاتوتیپی را گزارش کردند. در مطالعه دیگری نیز تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولیRAPD بررسی گردید و ۲۲گروه ژنوتیپی شناسایی شد. همچنین در مطالعه دیگری از همین پژوهشگران (Shokoohifar *et al*., 2006) که در شرایط آزمایشگاه و مزرعه صورت گرفت، واکنش ۴۲۰توده بومی و ۹۷دودمان رقم خارجی نخود مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که ژنوتیپ‌های MCC496، MCC133، MCC311، MCC299، MCC528 و MCC142 از تیپ کابلی و ژنوتیپ‌های MCC54 و MCC523 از تیپ دسی در برابر شش پاتوتیپ از بیماری برق‌زدگی مقاومت بالایی نشان داد. بهبود مقاومت میزبان به عنوان مهم‌ترین، کاراترین، سازگارترین با محیط‌زیست و نسبتاً اقتصادی‌ترین راهکار برای مدیریت و مقابله با هر بیماری است (Li *et al*., 2015). بنابراین استفاده از ارقام مقاوم جهت دستیابی به عملکرد بالا اهمیت اساسی دارد (Hassan *et al*., 2012). اما به‌دلیل ظهور مداوم پاتوتایپ‌های جدید قارچ *A. rabiei*، تولید ژنوتیپ‌های مقاوم با چالش بزرگی مواجه است (Sharma & Ghosh 2016). جداسازی و توالی‌یابی پیشبر فعال‌شونده توسط بیمارگر Ascochyta که باعث القاء بیان ژن پروتئین مرتبط با بیماریزایی (PR-10) در نخود می‌شود، توسط Kaseb *et al*, (2017) انجام شده است.

با توجه به اهمیت مقاومت به برق‌زدگی در نخود و شناسایی ژن مرتبط با پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی (PR) در گیاهان مختلف در این تحقیق ردیابی، توالی‌یابی و جداسازی ژنPR10 در ارقام مقاوم و حساس به برق‌زدگی نخود انجام شده است.

مواد و روش‌ها

کشت و آماده‌سازی مواد گیاهی

دراین آزمایش از دو ژنوتیپ حساس (MCC506 و MCC507)، دو ژنوتیپ مقاوم (MCC142 و MCC528) و دو ژنوتیپ متحمل (MCC20 و MCC150) نخود در برابر بیماری برق‌زدگی استفاده شد. بذرها از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. بذرها قبل از کشت با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲درصد به مدت ۱۵دقیقه ضدعفونی سطحی شده و پس از شستشو با آب‌مقطر، جهت جوانه‌زنی به پتری‌دیش‌های استریل حاوی کمی آب مقطر استریل انتقال داده شدند. سپس بذور جوانه‌زده، در گلدان‌هایی با قطر ۲۰سانتی‌متر با سه ترکیب پرلیت، کوکوپیت، ورمی‌کمپوست با نسبت ۱:۲:۱ در عمق ۲/۵سانتی‌متری کاشته حاوی خاک شدند. آبیاری گلدان‌ها در دو هفته اول به‌صورت دوبار در هفته انجام گرفت و سپس به سه‌بار در هفته افزایش پیداکرد. هر ۱۴روز آبیاری به صورت محلول آبیاری به اندازه ۱۵گرم کود کامل NPK ۲۰:۲۰:۲۰ در ۱۰لیتر آب انجام شد.

نمونه‌گیری و استخراج DNA

یک ماه بعد از کاشت، نمونه‌های برگی از گیاهان تهیه و استخراجDNA به روش CTAB (Probski *et al*., 1997) از آن‌ها انجام شد. به‌منظور بررسی کیفیت و کمیت DNA ژنومی مقدار چهار میکرولیتر از DNA استخراج‌شده بر روی ژل آگارز یک‌درصد بارگذاری شد. پس از الکتروفورز در ولتاژ ۸۰ولت، به مدت ۴۵دقیقه کیفیت DNA به کمک اشعهUV بررسی و عکس‌برداری شد. تخمین کمیت غلظت باندهایDNA براساس غلظت باند مارکر بر روی ژل آگارز یک درصد انجام شد.

طراحی آغازگر برای ردیابی و تکثیر توالی کامل ژن PR10

آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی ژنومی نخود به شماره بازیابیPGTT01000000 و با کمک توالیEST JZ585563.1 با استفاده از نرم‌افزار Primer premier شرکت Premier bio soft طراحی شد (جدول ۱).

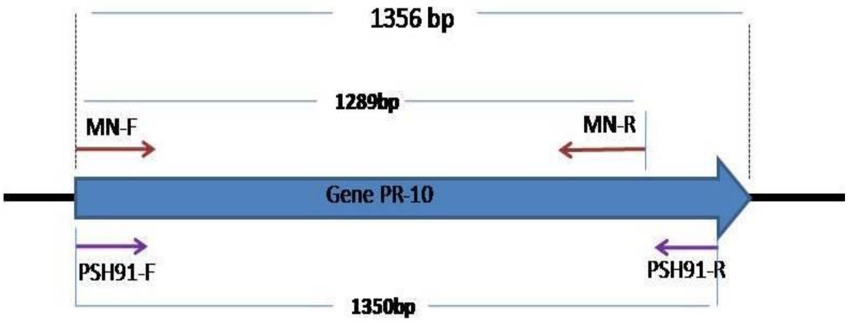
توالی ژن PR10 و محل آغازگرها جهت ردیابی ژن PR10

شکل۱، نمای شماتیک ژن*PR10* در سطح نوکلئوتیدی و محل اتصال آغازگرها را نشان می‌دهد. این ژن در گیاه نخود روی کروموزوم شماره۱ قرار دارد. انتظار می‌رود باندهای با اندازه ۱۳۵۶bp با آغازگرPSH91 و ۱۲۸۹bp با آغازگرMN مشاهده شود.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی و تکثیر توالی کامل ژن PR10

Table 1. Employed primers to detection and amplification of whole sequence of PR10 gene

نوع آغازگر Primer type	توالی آغازگر Primer sequence	تعداد نوکلئوتید Nucleotide number	Tm (°C)
PSH91.F	5' ATTCATCACCATGGGTGTTTTCAG 3'	24	62.7
PSH91.R	5' ACACACGTGGTGTAATAAAAGCACTTA 3'	27	61.9
MN.F	5' ATGGGTGTTTTCAGTT 3'	16	40.5
MN.R	5' ATAACCCTCAAGTGCC 3'	16	43.8



شکل۱- نمای شماتیک ژنPR-10 و ناحیه اتصال آغازگرهایPSH-91 و MN به ژنPR-10

Fig. 1. Schematic view of PR-10 gene and connecting region of PSH-91 and MN primers to gene

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

محتویات واکنش شامل ۵۰نانوگرم DNA ژنومی ارقام مقاوم و حساس نخود در حجم کل ۲۰میکرولیتر حاوی ۲میلی مولار MgCl2، ۲۰۰میکرومول dNTPs (GeNetBio, south Korea)، ۲میکرولیتر بافر PCR 10X (GeNetBio, south Korea)، ۵پیکومول از آغازگرهای رفت و برگشت PSh91-F/R و MN-F/R (سنتزشده توسط BioNeer Co., south Korea) و یک واحد آنزیم تگ‌پلیمراز (Taq DNA polymerase, GeNetBio, south Korea) تهیه شد.

برنامه دمایی واکنش در مرحله واسرشت اولیه به مدت ۵دقیقه در دمای ۹۴درجه سانتی‌گراد و ۳۵سیکل در ۹۲درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۳ثانیه، مرحله اتصال به مدت ۴۵ثانیه و در دمای ۶۲درجه‌سانتی گراد، مرحله تکثیر در ۷۲درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت ۷۲درجه سانتی‌گراد به مدت ۵دقیقه توسط دستگاه ترموسایکلر انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱درصد در ولتاژ ثابت ۸۰ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز گردید. از غلظت 1X بافر SB در تهیه ژل و بافر تانک الکتروفورز استفاده شد.

تخلیص باند محصولات PCR از روی ژل و توالی‌یابی

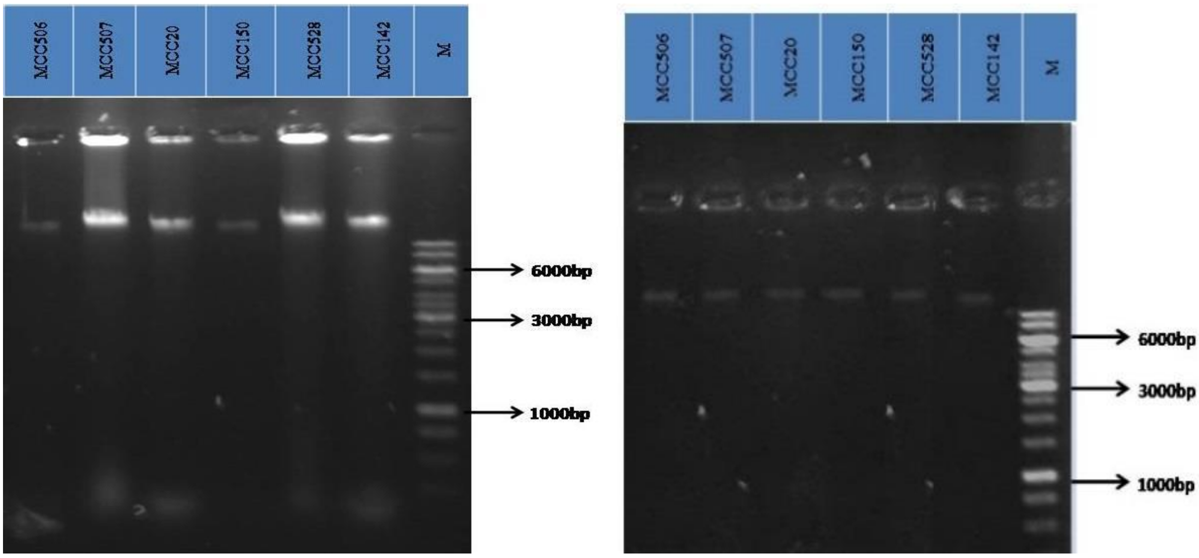
استخراج ژن ردیابی‌شده با استفاده از کیت Gel extraction kit ساخت شرکت دنازیست و مطابق دستورالعمل مربوطه انجام گردید و سپس جهت توالی‌یابی، سازه‌های ژنی PR-10 به همراه آغازگرها جهت توالی‌یابی ارسال گردید. نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار SeqMan مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

جوانه‌زنی گیاهان تقریباً به‌صورت همزمان صورت گرفت. شاخه‌زایی گیاهان مقاوم و متحمل بیشتر از ارقام حساس بود و رقم حساس گیاهی ضعیف و با شاخه‌های اندک تولید کرد. رقم‌های مقاوم و متحمل دارای بذر فراوان‌تر بوده و زودتر از ارقام حساس به گل رفته و تولید بذر کردند.

کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده

دسترسی به DNA با کیفیت و کمیت مناسب پیش‌نیاز اولیه بررسی‌های ژنتیکی مولکولی می‌باشد. غلظت و کیفیت پایین DNA اعتبار داده‌های حاصله را تحت تأثیر قرار داده و تکرارپذیری آن را کاهش می‌دهد. الگوی الکتروفورزی DNA استخراج‌شده از ارقام مقاوم، متحمل و حساس نخود، در شکل1A نشان داده شده است. پس از استخراج نمونه‌ها به منظور انجام واکنش PCR نمونه‌ها در غلظت تقریبی ۳۰نانوگرم در میکرولیتر شدند.



شکل ۲- DNA :A استخراج‌شده از ارقام MCC142، MCC528، MCC150، MCC20، MCC506 و MCC507 نخود روی ژل الکتروفورز؛

DNA :B هم‌غلظت‌شده این رقم‌ها روی ژل الکتروفورز

Fig 2. A: Extracted DNA from chickpea cultivars of MCC142, MCC528, MCC150, MCC20, MCC506 and MCC507 on electrophoresis gel; B: Equal concentration of DNA from these cultivars on electrophoresis gel

به‌دلیل اختصاصی‌بودن آغازگر در دامنه دمایی مختلف باند مشاهده شد، ولی بهترین باند در دمای ۶۰ و ۶۲درجه سانتی‌گراد حاصل گردید. نتایج این قسمت در هر چاهک نشان داد که آغازگرهای طراحی‌شده براساس توالی ژن PR-10 توانسته‌اند منطقه‌ای با اندازه مورد انتظار را تکثیر نمایند.

تکثیر قطعه هدف از ارقام مختلف و ارائه الگوی حضور باند هدف

پس از انجام واکنش PCR جهت مشاهده نتیجه محصولات PCR را روی ژل یک‌درصد برده و ارقام مختلف مقایسه شدند. با توجه به آنچه گفته شد، اولین مرحله PCR با آغازگر PSH-91 انجام شد که حاصل آن مشاهده باند با اندازه مورد انتظار یعنی ۱۳۵۰bp در تمام نمونه‌ها به‌جُز نمونه MCC507 که جزء ارقام حساس می‌باشد، بود.

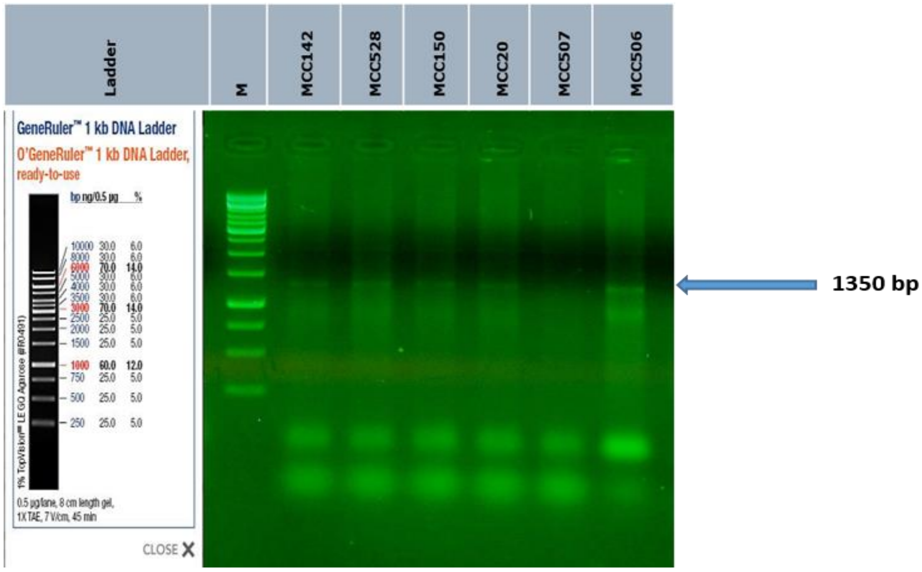
در مرحله دوم، PCR با استفاده ازمحصولات واکنش قبلی (به‌عنوان الگو) با آغازگرMN انجام شد. فقط در نمونهMCC20 جهت DNA الگو از خود DNA استخراج‌شده از گیاه استفاده شد و از محصول واکنش PCR استفاده نشد. در واقع تفاوتی بین این که از محصول PCR برای واکنش دوم استفاده شود یا از DNA اصلی استخراج‌شده از گیاه، وجود ندارد.

با توجه به حضور ژن در ارقام مقاوم، حساس و متحمل این فرضیه مطرح شد که شاید تنوع در توالی این ژن در ارقام با سطوح مقاومتی مختلف مشاهده گردد.

توالی‌یابی ژنPR-10 در ارقام مقاوم، متحمل و حساس

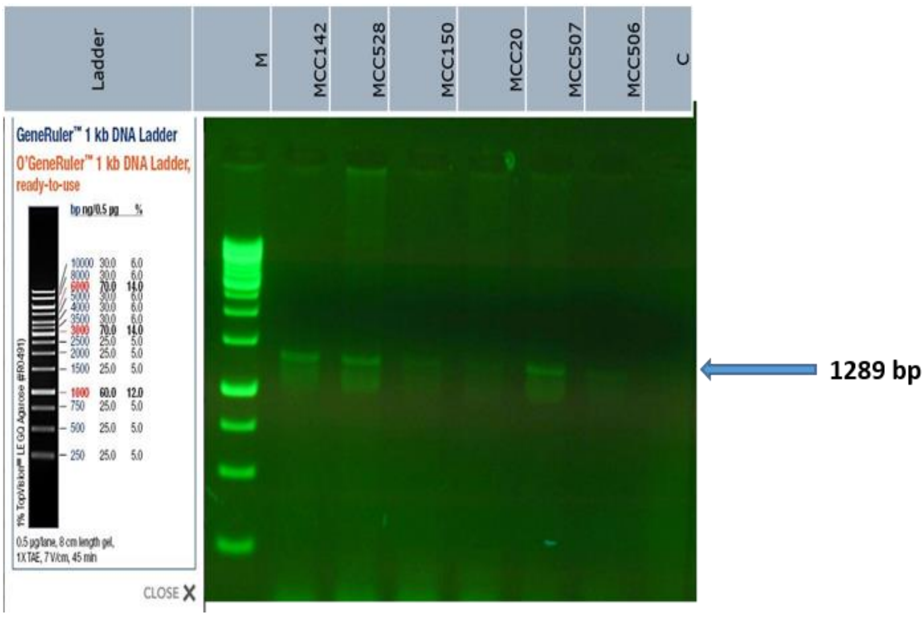
در این مطالعه حضور ژنPR-10 به عنوان عامل مقاومت به بیماری برق‌زدگی در ارقام مقاوم، متحمل و حساس مورد بررسی قرار گرفت. سپس قطعه ژنPR-10 در کلیه ارقام بالا با واکنش PCR تکثیر شد. به منظور تأیید نهایی توالی‌یابی دوجهته صورت گرفت که نتایج توالی‌یابی حضور ژنPR-10 را در کلیه نمونه‌های بالا مورد تأیید قرار داد. هدف مهم بعدی بررسی جهش‌های احتمالی موجود در این ارقام بود. جهش‌ها در دو سطح نوکلئوتیدی و بیان پروتئین قابل بررسی می‌باشد. نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار SeqMan بررسی شد. توالی‌یابی نمونه‌ها و مقایسه خوانش‌های رفت و برگشت حاصل از توالی‌یابی برای هر نمونه انجام شد. نتایج توالی‌یابی ارقام مختلف مقاوم و حساس در شکل‌های ۵ تا ۹ نشان داده شده است.

با توجه به تفاوت‌های حاصل بین توالی رفت و برگشت هر نمونه توالی نهایی به‌دست آمد که ظاهراً تعدادی جهش را نشان می‌داد. جهت بررسی تفاوت‌های مشاهده‌شده و اطمینان از صحت وجود جهش در توالی‌ها، آن‌ها با توالی رفرنس مقایسه شدند.



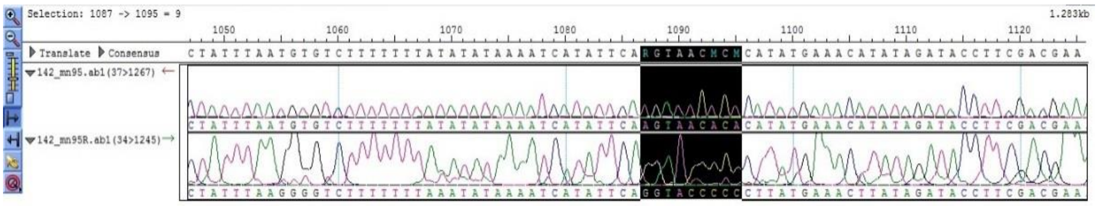
شکل۳- تولید قطعه ۱۳۵۰جفت بازی DNA به‌وسیله تکثیر PCR با استفاده از آغازگرPSH-91 در همه رقم‌ها، نشان‌دهنده وجود ژن PR-10 در ژنوم همه آن‌ها است.

Fig. 3. Production of 1350 bp DNA fragment by PCR amplification using PSH-91 primer in all cultivars indicated to existence of PR-10 gene in their genome.



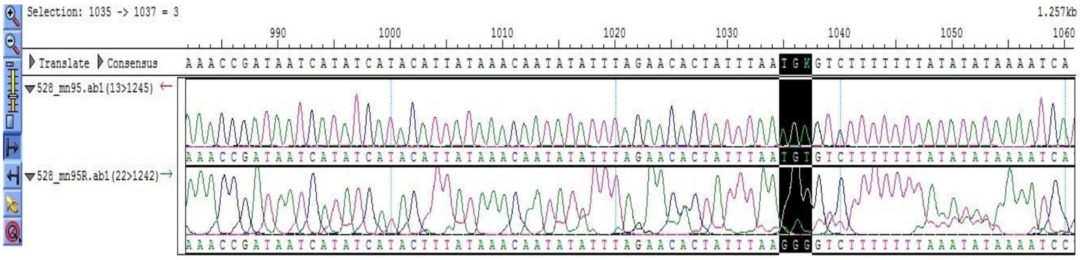
شکل ۴- تولید قطعه ۱۲۸۹ جفت بازی DNA به‌وسیله تکثیر PCR با استفاده از آغازگرMN در همه رقم‌ها نشان دهنده وجود ژنPR-10 در ژنوم همه آن‌ها است.

Fig. 4. Production of 1289 bp DNA fragment by PCR amplification using MN primer in all cultivars indicated to existence of PR-10 gene in their genome.



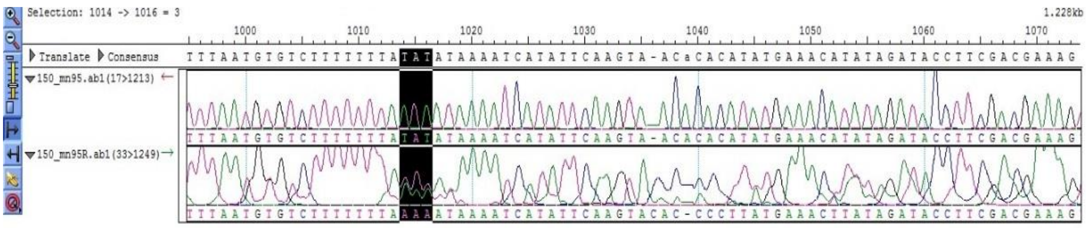
شکل۵- توالی‌یابی دوطرفه رفت و برگشت ژن PR-10 از واریته MCC142 (مقاوم به برق‌زدگی)

Fig. 5. Forward and reverse sequencing of PR-10 gene derived from MCC142 variety (resistant to Ascochyta blight)



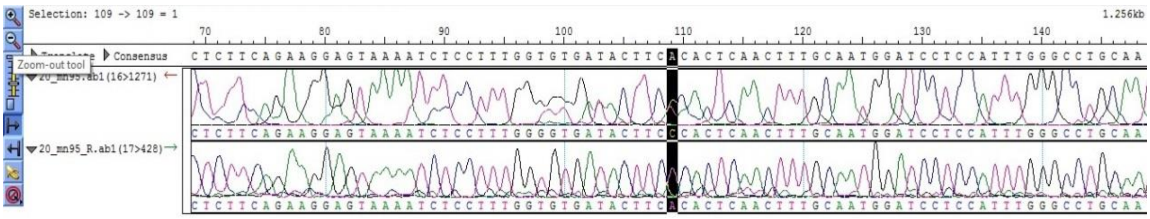
شکل۶- توالی‌یابی دوطرفه رفت و برگشت ژن PR-10 از واریته MCC528 (مقاوم به برق‌زدگی)

Fig. 6. Forward and reverse sequencing of PR-10 gene derived from MCC528 variety (resistant to Ascochyta blight)



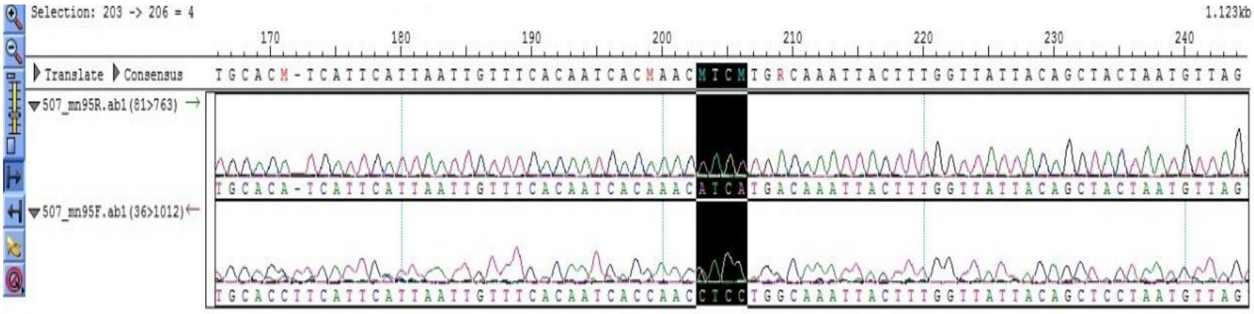
شکل۷- توالی‌یابی دوطرفه رفت و برگشت ژن PR-10 از واریته MCC150 (متحمل به برق‌زدگی)

Fig. 7. Forward and reverse sequencing of PR-10 gene derived from MCC150 variety (tolerant to Ascochyta blight)



شکل۸- توالی‌یابی دوطرفه رفت و برگشت ژن PR-10 از واریته MCC20 (متحمل به برق‌زدگی)

Fig. 8. Forward and reverse sequencing of PR-10 gene derived from MCC20 variety (tolerant to ascochyta blight)



شکل۹- توالی‌یابی دوطرفه رفت و برگشت ژنPR-10 از واریتهMCC507 (حساس به برق‌زدگی)

Fig. 9. Forward and reverse sequencing of PR-10 gene derived from MCC507 variety (susceptible to Ascochyta blight)

به‌دست‌آوردن توالی توافقی برای ژنPR-10

پس از بررسی توالی نمونه‌ها با یکدیگر یک توالی توافقی به‌دست آمد. این توالی در نرم‌افزارSeqMan با توالی رفرنس مقایسه شد. در این مقایسه مشخص شد که تفاوت‌های مشاهده شده در آزمون قبلی ناشی از خطای توالی‌یابی بوده است و لذا بررسی‌ها عدم وجود تفاوت بین این توالی توافقی، توالی ژنوم نخود و توالی رفرنس را نشان داد. در واقع چون این مناطق در انتهای منطقه خوانش بوده است، به‌همین دلیل کیفیت توالی‌یابی در این قسمت کاهش یافته است و به‌عنوان جهش درنظرگرفته نمی‌شود. نتیجه نهایی این‌که توالی این ژن درمنطقه بررسی‌شده بین ارقام مقاوم و حساس و توالی رفرنس یکسان می‌باشد.



شکل ۱۰- مقایسه توالی ژنPR-10 ارقام مختلف نخود با توالی رفرنس نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت بین توالی‌ها با توالی رفرنس می‌باشد.

Fig. 10. Comparison of PR-10 gene sequence of different chickpea varieties with reference sequence indicated to lack of difference between sequences and reference sequence also.

با توالی‌یابی ژنوم میزبان‌ها و بیمارگرها مشخص شد که نسبت زیادی از ژن‌ها برای دفاع در مقابل بیمارگرها یا ازبین بردن مقاومت میزبان اختصاص یافته‌اند. دستیابی به توالی ژن‌های مقاومت درتولید ارقام مقاوم ارزش بالایی دارد. ژن کُدکننده پروتئینPR-10 به‌عنوان عامل مقاومت در مقابل بیماری برق‌زدگی می‌تواند شناخته شود که جهت اطمینان از ایجاد مقاومت توسط این پروتئین نیاز به بررسی بیان پروتئین در شرایط مختلف می‌باشد. نتایج PCR با پرایمرPSH-91 حضورPR-10 را در شِش رقم نخود مورد مطالعه نشان داد. نتایج الگوی الکتروفورزی محصولPCR با پرایمرPSH-91 در بین ارقام مقاوم، متحمل و حساس یکسان است.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان بیان کرد که در طی PCR با پرایمر موردنظر در بین ارقام مقاوم، متحمل و حساس موفق به ردیابی ژنPR-10 شدیم و اندازه باندها در تمام ارقام ۱۳۵۰bp می‌باشد که این نشان‌دهنده الگوی باندی مشابه در بین ارقام مختلف بوده است. با توجه به وجود این ژن در ارقام حساس این نتیجه حاصل می‌شود که واکنش متفاوت ارقام مختلف در برابر بیماری برق‌زدگی نخود می‌تواند ناشی از تفاوت در بیان ژنPR-10 باشد. پروتئین‌هایPR-10 پروتئین‌های

دفاعی داخل سلولی می‌باشند که ساختاری شبیه ریبونوکلئازها دارند. تمام پروتئین‌هایPR-10 اسیدی بوده ودر هیچ‌یک از آن‌ها سیگنال پپتیدی وجود ندارد. این موضوع نشان می‌دهد که پروتئین‌های این خانواده درون‌سلولی هستند و توسط بیمارگرها القاء می‌شوند (Vidhyasekaran, 2002). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان بیان کرد به علت عدم وجود تنوع در توالی نوکلئوتیدی، این احتمال وجود دارد که در هنگام بیان پروتئین در شرایط وجود عامل بیماری، تفاوت بین ارقام مختلف نشان داده شود که این احتمال با توجه به تحقیقاتی که بر ژنPR-10 برنج صورت گرفته است، تأیید می‌شود (Babaiezadeh & Sayyari, 2012). ژنPR-10 در برنج به‌طور طبیعی در برگ‌ها بیان نمی‌شود و به زخم‌ها واکنش نشان نمی‌دهد، اما بالقوه در سطح بالایی به‌وسیله اتیلن و جاسمونیک اسید بیان می‌شود (Heidarinejad *et al.*, 2014). همچنین در بررسی رقم مقاوم و حساس به عامل بیماری سوختگی غلاف برنج، بیان ژنPR-10 در ارقام مقاوم در مقایسه با ارقام حساس به بیماری افزایش معنی‌داری نشان داده است (Babaiezadeh & Sayyari, 2012).

تنها PR پروتئین شناسایی‌شده در نخود PR-2 می‌باشد. ۱۴روز پس از تلقیح نخود با *Ascochyta rabiei*، فعالیت آنزیم ۱و ۳ گلوکاناز مشاهده شده است (Hanselle & Barz, 2001). همچنین ۲ کتیناز و ۳ بتا ۱و۳ گلوکاناز در گیاه نخود علیه عامل بیاماری برق‌زدگی کشف شده است (Saikia *et al.*, 2005). به‌نظر می‌رسد که پروتئینPR-10 در گیاهان مختلفی ایجاد مقاومت می‌کند. به‌عنوان مثال در گیاه فلفل در برابر قارچ مولد بیماری سیاه‌تاول (Soh *et al.*, 2012)، در برنج در برابر *Magnaporthe grisea* (McGee *et al.*, 2001)، در چغندر در برابر BNYVV (Wu *et al.*, 2014) و در سورگوم بر علیه قارچ فوزاریوم (Katile *et al.*, 2010) بیان شده است.

منابع

1. Ahmadi, K., Gholizadeh, H., Ebadzadeh., H.R., Hosseinpour, R., Hatami, F., Fazli, B.,kazemian, A. and Rafiee, M. 2016. Agricultural Statistics. First Volume. Ministry of Jihad-e-Agriculture, Deputy Director of Planning and Economics, ICT Center. Iran.(In Persian).
2. Babaeizadeh, V., and Sayyai, M. 2013. Intervention of Lipoxigenase gene and multiple pathogenesis-related (PR) genes in the resistance of tarom and anonymous cultivars of rice to *Rhizoctonia solani* Disease. 12th Iranian Congress of Genetics. May 21-23, 2012. Tehran. (In Persian).
3. FAO, 2014. FAOSTAT Database Results from FAO Website. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
4. Fernandes, H., Michalska, K., Sikorski, M., and Jaskolski, M. 2013. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. FEBS Journal 280(5): 1169-1199.
5. Ghiai, S., Razavi, M., and Shahriary, D. 2012. Study on pathogenic and molecular variability in some isolates of *Ascochyta rabiei* causal agent of Ascochyta blight of chickpea in Iran. Journal of Applied Entomology and Phytopathology 79: 199-218.
6. Hanselle, T., and Barz, W. 2001. Purification and characterisation of the extracellular PR-2b β-1, 3-glucanase accumulating in different *Ascochyta rabiei*-infected chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. Plant Science 161(4): 773-781.
7. Heidarinezhad, M., Babayei Zadeh, A., and Rahimian, H.A. 2015. The role of genes related to pathogenicity PR10 and PR2 in rice in resistance to *Acidovorax avenae* subsp. Avenae. First National Congress of Biology and Natural Sciences of Iran. https://www.civilica.com/Paper-BSCONF01-BSCONF01_101.html (in Persian).
8. Jain, S., Kumar,D., Jain, M., Chaudhary, P., Deswal, R., and Sarin, N.B. 2012. Ectopic overexpression of a salt stress-induced pathogenesis-related class 10 protein (PR10) gene from peanut (*Arachis hypogaea* L.) affords broad spectrum abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 109(1): 19-31.
9. Ghannadha, K., and Zahrawi, M. 2006. Areas of construction, operation and engineering of resistance genes in plants. The 9th Iranian Congress of Agronomy and Plant Breeding. Tehran University. Pardis Abooreihan. (in Persian). https://www.civilica.com/Paper-NABATAT09-NABATAT09_007.html
10. Ghazanfar, M.U., Wakil, W., and Sahi, Sh.T. 2011. Induction of resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against *Ascochyta rabiei* by applying chemicals and plant extracts. Chilean Journal of Agricultural Research 71(1): 52-62.
11. Hassan, S.I., Hameed, A., Tariq, M., and Arshad, M. 2012. Pearl: A high yielding and full season white maiz variety. Journal of Agricultural Research 50(3): 329-334.

12. Hashemi, S., Babaeizad, V., Tajik, M.A., and Rahimian, H. 2013. Studying of several Pathogenesis-related genes role in rice resistance *Bipolaris oryzae*. Iranian Journal of Plant Pathology 49(2): 57.
13. Kaseb, A. 2017. Tracking and sequence analysis of the PR10 gene promoter from chickpea plant (MSc. Thesis). Retrieved from IRANDOC Database. (Accession No. 2443873).
14. Katile, S.O., Perumal, R., Rooney, W.L., Prom, L.K., and Magill, C.W. 2010. Expression of pathogenesis-related protein PR-10 in sorghum floral tissues in response to inoculation with *Fusarium thapsinum* and *Curvularia lunata*. Molecular Plant Pathology 11(1): 93-103.
15. Leo, A.E., Linde, C.C., and Ford, R. 2016. Defence gene expression profiling to *Ascochyta rabiei* aggressiveness in chickpea. Theoretical and Applied Genetics 129: 1333-1345.
16. Li, H., Rodda, M., Gnanasambandam, A., Aftab, M., Redden, R., Hobson, K., Rosewarne, G., Materne, M., Kaur, S., and Slater, A.T. 2015. Breeding for biotic stress resistance in chickpea: progress and prospects. Euphytica 204: 257-288.
17. Liu, J.J., and Ekramoddoullah, A.K. 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. Physiological and Molecular Plant Pathology 68(1): 3-13.
18. McGee, J.D., Hamer, J.E., and Hodges, T.K. 2001. Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. Molecular Plant-Microbe Interactions 14(7): 877-886.
19. Moosa, A., Farzand, A, Sahi, S.T., and Aleem Khan, A. 2017. Transgenic expression of antifungal pathogenesisrelated proteins against phytopathogenic fungi-15 years of success. Israel Journal of Plant Sciences, ISSN: 0792-9978 (Print) 2223-8980 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/tips20. DOI: 10.1080/07929978.2017.1288407.
20. Nourollahi, K., Javannikhah, M., Naghavi, M.R., and Okhvt, S.M. 2009. Pathogenic diversity in *Didymella rabiei* from the western Iranian Ilam and Kermanshah provinces. Journal of Plant Protection 23: 56-65.
21. Saikia, R., Singh, B.P., Kumar, R., and Arora, D.K. 2005. Detection of pathogenesis-related proteins-chitinase and β -1,3-glucanase in induced chickpea. Current Science 89: 659-663.
22. Sharma, M., and Ghosh, R. 2016. An update on genetic resistance of chickpea to ascochyta blight. Agronomy 6: 18. doi:10.3390/agronomy6010018.
23. Shokoohifar, F., Bagheri, A., and Falahati Rastgar, M. 2003. Identification of genetic diversity in the Ascochyta blight pathogen of chickpea [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.] Using RAPD markers. JWSS-Isfahan University of Technology 7(2): 193-204.
24. Shokoohifar, F., Bagheri, A.R., and Falahati Rastgar, M. 2006. Identification of resistant chickpea lines against pathotypes causing Ascochyta blight disease in Iran. Iranian Journal of Biology 19(1): 29-42.
25. Soh, H.C., Park, A.R., Park, S., Back, K., Yoon, J.B., Park, H.G., and Kim, Y.S. 2012. Comparative analysis of pathogenesis-related protein 10 (PR10) genes between fungal resistant and susceptible peppers. European Journal of Plant Pathology 132(1): 37-48.
26. Taran, B., Warkentin, T., and Vandenberg, A. 2013. Fast track genetic improvement of Ascochyta blight resistance and double podding in chickpea by marker-assisted backcrossing. Theoretical and Applied Genetics 126(6): 1639-1647.
27. Udupa, S., and Baum, M. 2003. Genetic dissection of pathotype-specific resistance to Ascochyta blight disease in chickpea (*Cicer arietinum* L.) using microsatellite markers. Theoretical and Applied Genetics 106(7): 1196-1202.
28. Vidhyasekaran, P. 2002. Bacterial Disease Resistance in Plants: Molecular Biology and Biotechnological Applications. Routledge. 322pp
29. Wu, W.Q., Fan, H.Y., Jiang, N., Wang, Y., Zhang, Z.Y., Zhang, Y.L., Wang, X.B., Li, D.W., Yu, J.L., and Han, Ch.G. 2014. Infection of Beet necrotic yellow vein virus with RNA4-encoded P31 specifically up-regulates pathogenesis-related protein 10 in *Nicotiana benthamiana*. Virology Journal 11(1): 118.
30. Yadav, P., Tripathi, D.K., Kafeel Khan, K., and Yadav, A.K. 2015. Determination of genetic variation and heritability estimates for morphological and yield traits in chickpea (*Cicer arietinum*) under late sown conditions. The Indian Journal of Agricultural Sciences 85(7): 116-129.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 11, No. 1, 2020, p. 26-37 (Research Article)

Tracing and sequencing of pathogenesis-related (PR) protein 10 gene in chickpea (*Cicer arietinum* L.)

Noori Shekartoo[1], M., Zaker Tavallaie[2*], F. & Shokoohifar[3], F.

1. MSc. in Plant Biotechnology, Higher Education Complex of Shirvan, Shirvan, Iran; mnoori20409@gmail.com
2. Assistant Professor, Plant Biotechnologist, Department of Plant Production, Higher Education Complex of Shirvan, Shirvan, Iran
3. Assistant Professor, Plant Biotechnology, Legumes Department, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad; shokouhifar@um.ac.ir

Received: 19 June 2018
Accepted: 18 July2018

DOI: 10.22067/ijpr.v11i1.73594

Introduction

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is an especial important crop among Pulse crops. One of the most important factors limiting the yield of chickpea is fungal diseases. Ascochyta blight is the most problematic disease of chickpea. The fungus *Ascochyta rabiei* (also called *Didymella rabiei*) causes ascochyta blight of chickpea. Pathogenesis related (PR) proteins are one of the ways to control plant pathogens. These proteins are encoded by the host plant, but their express done only in the presence of disease agent or the related conditions (Ghannadha *et al.,* 2006). PR-proteins are a variety group of proteins including: glucanase, chitinases, endoproteinase, peroxidases, protease inhibitors, as well as small proteins such as osmotins, thionins, defensins, and lipid transfer proteins (Jain *et al.*, 2012). So far seventeen PR proteins have been identified (Liu *et al.*, 2006). PR-2 is the only PR-protein that identified in chickpea. The PR-10 has many functions. Direct evidence of antimicrobial activity induced by PR-10 is known in microbiological labs. The ability to connect to ligands is also observed. It also has an enzymatic activity in the secondary metabolism of plants and plays a role in abiotic stresses (Liu *et al.*, 2006). This research was done to detect *pr-10* gene in chickpea genome.

Materials & Methods

In this experiment, six genotypes of chickpea, including two sensitive genotypes (MCC506 and MCC507), two resistant genotypes (MCC142 and MCC528) and two tolerant genotypes (MCC20 and MCC150), against ascochyta blight were used. The seeds were surface sterilized using 2% sodium hypochlorite and germinated in sterile petri dishes. The germinated seeds were planted in pots (with 20 cm in diameter) containing combination of perlite, coco peat and vermicompost with a ratio of 1: 2: 1 at a depth of 2.5 cm. After one month, DNA extraction was down from leaves using CTAB method. RCR reaction was down using primers of PSH-91 and MN in 2 steps. These primers were designed using Primer software Ver.5. The first step was performed using PSH-91 primer on genomic DNA and second step using MN primer on first PCR product. The detected gene was extracted using a Gel extraction kit manufactured by Denazist Company. Then PR-10 gene constructs were sequenced. Sequencing results were analyzed using SeqMan software.

Results & Discussion

Germination of plants was almost simultaneously. The shoot production of resistant and tolerant plants was more than sensitive cultivars. Resistant and tolerant varieties reached to flowering stage earlier and produced more abundant seed rather than sensitive cultivars. The presence of a single-band 1350 bp in the first PCR and a single-band 1289 bp in the second PCR indicated to presence of the PR-10 gene in the chickpea genome. The results of this research indicated that there is no difference in sequence of coding gene of PR-10 protein in chickpea genome with different resistance levels.

*Corresponding Author: f.zaker.t@um.ac.ir

Conclusion

Due to the lack of diversity in the nucleotide sequence of pr-10 gene among resistant and sensitive cultivars, it is likely that when the protein is expressed in the presence of the disease agent, the expression difference between the different varieties is shown. This seems reasonable considering research on the pr-10 rice genes (Babaiezadeh & Sayyari, 2012). The PR-10 gene in rice is naturally not expressed in leaves and does not respond to ulcers, but it has high expression potential in the presence of ethylene and jasmine acids (Heidarinejad *et al.*, 2014). Also, in evaluating the resistant and susceptible cultivar of rice blight pods disease, PR-10 gene expression in resistant cultivars was significantly increased compared with susceptible cultivars (Babaiezadeh and Sayyari, 2012). It seems that additional experiments are necessary in disease condition on expression of pr-10 gene in chickpea.

Keywords: Ascochyta blight, *Cicer arietinum* L., Pathogenesis related (PR) proteins, *pr*-10 gene